

生物医学微流体应用中的高速成像： 原理与概述

作者: Vision Research Inc. 的现场应用工程师 · Kyle D. Gilroy 博士

微流体技术是一个高度交叉的领域,它采用最先进的微流体芯片技术来引导流体和内部的微小物体通过具有微小横截面的通道。在生物医学微流体应用的背景下,这些微小的物体通常是尺寸在 1 至 100 微米范围内的细胞。该领域的典型研究包括跟踪、识别、分选、诊断和/或封装单个细胞。要成功进行这些研究,需要一个将传统的显微镜技术、精心设计的微流控设备以及高速成像技术集成在一起的实验系统。

在我们的日常生活中,几乎每个人都可以捕捉以每秒 1 米的速度在空中飞行的物体(例如棒球)的高质量视频。然而,在微观尺度上,拍摄以相同速度移动的物体却非常具有挑战性。这是因为捕捉高速微对象通常需要数十万的帧速率和几微秒的曝光时间。从本文讨论的实例探究中可以看出,在生物医学微流体应用中采集高质量视频数据不仅需要高速和超高速摄像机,而且还需要理解基本的微流体物理知识和成像原理。

在本文的开头有一组基本方程式,可用于帮助理解微流体学中涉及的基本物理原理。然后,本文总结了一系列最近同行审阅的文章,在这些文章中,高速摄像机被用来:跟踪和量化细胞轨迹,观察细胞在变形性细胞术过程中的拉伸,引导和分离循环肿瘤细胞以及封装和分选单个细胞。

基本成像原理

微型成像的许多挑战是常规高速摄影所面临的挑战。主要挑战是视野大大减小,并且对象尺寸更小。为了获得高质量的图像数据,必须 (i) 有足够高的帧速率,并 (ii) 减少由于长时间曝光和/或快速移动的微物体而导致的图像模糊。这些挑战的根源可以在图 1 所示的示意图中看到,该图显示了同一微球的两个连续帧(帧 1 和帧 2),该微球以 v_{spher} 的速度通过微流体通道,摄像机以 FR 的帧速率和 t_{exp} 的曝光时间拍摄了这一过程。帧速率确定了微球在后续帧捕捉之间移动的有效距离 (d_{frame}),其定义如下:

$$d_{frame} = v_{spher} \times (FR)^{-1} \quad (1)$$

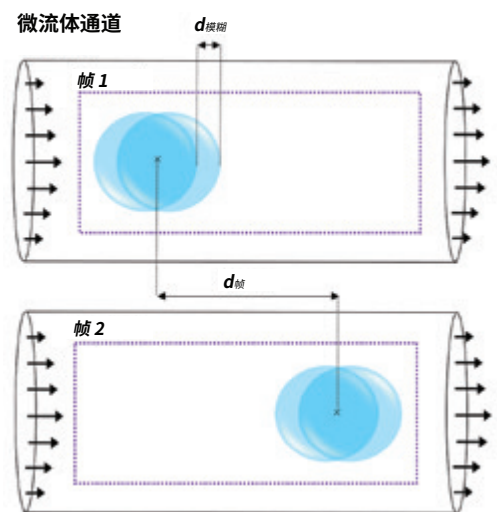


图1: 示意图显示了一个微球穿过微通道的两个连续帧,说明了运动模糊的概念和帧之间移动的距离。在每个帧中,后面和前面的球体分别代表曝光开始和结束时的瞬时球形轮廓。

生物医学微流体应用中的高速成像:原理与概述

如果将标准摄像机安装在一个带有 2 mm 直径圆形视场的 10 倍物镜的通用实验室显微镜上,您会发现,拍摄以 $1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ (或等效为 $1 \text{ } \mu\text{m} \cdot \mu\text{s}^{-1}$) 的表现“慢速”线性移动的微小对象(即细胞)将非常困难。实际上,录制一个至少需要 10 帧才能显示一个完整细胞的视频需要至少约 5500 帧/秒 (fps) 的帧速率!此外,过度的曝光时间(例如 $\sim 100 \text{ } \mu\text{s}$) 将使细胞看起来像条状而不是其自然的圆形轮廓,从而导致有价值的形状信息丢失。这种情况称为运动模糊,是一种光学图像缺陷,导致拍摄对象

在运动方向上看起来像被拉长一样。微球的模糊长度 ($d_{\text{模糊}}$) 与 v_{sphr} 和曝光时间 (t_{exp}) 直接相关,其定义如下:

$$d_{\text{模糊}} = v_{\text{sphr}} \times t_{\text{exp}} \quad (2)$$

因此,一个以 $1 \text{ } \mu\text{m} \cdot \mu\text{s}^{-1}$ (曝光时间设置为 $10 \text{ } \mu\text{s}$) 移动的 $10 \text{ } \mu\text{m}$ 球形细胞的运动模糊百分比 (%模糊) 在运动方向上将为 100%, 如以下公式所示:

$$\% \text{模糊} = 100 \times d_{\text{模糊}} \times \text{细胞尺寸}^{-1} \quad (3)$$

在某些新兴的微流体应用中,研究人员想要捕获以高达 $7 \text{ } \mu\text{m} \cdot \mu\text{s}^{-1}$ 的速度移动的细胞运动,这将需要数十万次的帧速率和微秒和亚微秒级的曝光时间。这些参数在以下部分中至关重要,尤其是在讨论变形性细胞术时。

总体而言,根据经验,在进行微流体实验之前,最好进行一些粗略的计算,使用方程式 1 和 2 根据近似的细胞尺寸、速度、视场和您希望细胞在序列帧之间移动的最小距离来估计所需的 FR 和 t_{exp} 。

实验装置

在许多生物医学微流控应用中,注射泵被用来在微流体芯片的入口上提供正压,迫使注射器中含细胞的流体渗透过芯片并最终进入单独的收集容器。图 2A 为一个典型的台式设置,其中的注射器和注射泵与微流体芯片串联连接,微流体芯片由高强度光纤照明器提供背光。注意:在本例中,样品通过尼康 SMZ18 显微镜放大并用 Phantom VEO 640S 高速摄像机进行成像,但这两个硬件可以更换为其他型号。然而,将高速摄像机与显微镜相连的最常见方法是通过 C 卡口适配器,适配器可连接至摄像机的正面,然后连接至兼容的显微镜,请参见图 2B。这种设置几乎可以与所有透明的微流体设备一起使用,请参见图 2C,以拍摄商用 8 通道芯片的特写照片。

与传统的高速成像相比,它的一个优势是,可以使用强烈的背光源来避免常见的光不足问题,这种问题通常出现在依赖于与摄像机视角成斜角放置的光源散射光子的应用中。尽管这种设置可以适应各种生物医学微流体应用,但每个研究都有自己特定的设备(例如压力控制器、摄像机、显微镜、微流体设备等)。

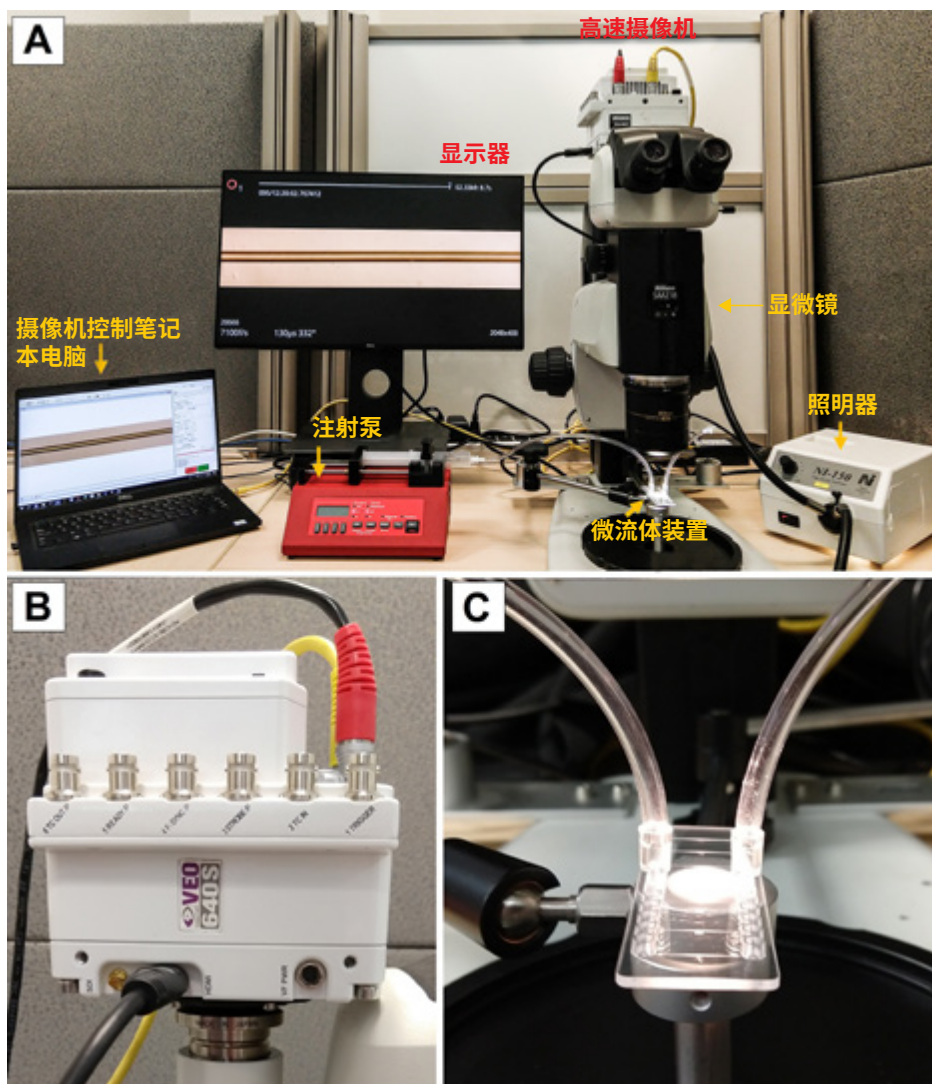


图2: (A) 微流体装置, (B) 高速摄像机的特写视图, 以及 (C) 8 通道微流体芯片。

生物医学微流体应用中的高速成像:原理与概述

追踪细胞轨迹

微流体力学的一种应用是观察和量化微通道网络内细胞的轨迹。即使是看似简单的应用,量化通过微流体设备的细胞轨迹也可能非常复杂。研究人员对这一领域有极大的兴趣是因为,了解穿过微流体通道的细胞的位置和速度可以提供有关通道设计的信息,甚至提供细胞的生物力学特性(例如,刚度、粘附力、弹性)。¹ 基于这一动机,佐治亚理工学院和埃默里大学的研究人员证明了流过脊状微流体通道的细胞的刚度可能与细胞的轨迹直接相关。¹ 图 3A 为一个微流体设置的示意图,其中的注射泵会迫使含有 K562 淋巴瘤细胞的溶液通过微流控装置(浓度为 1 百万个细胞·mL⁻¹,流速为 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)。所得的明场图像用尼康 Eclipse Ti 倒置显微镜(20 倍)进行放大,然后被传送给以 640×480 的低分辨率和 800 fps 的速度运行的 Phantom v7.3 高速摄像机中的传感芯片上,以便处理。图 3B 显示了三种不同细胞的彩色轨迹。

在本实例探究中,进行了两个实验,这两个实验唯一的区别是细胞的刚度。在一个实验中,使用了普通的 K562 细胞流经设备,而另一个实验则使用了软化的 K562 细胞。为了软化细胞,用肌动蛋白解聚剂细胞松弛素 D 对细胞进行了处理。在对结果进行分析和比较之后,他们得出结论,测量的轨迹在很大程度上受细胞刚度的影响,此外,通过计算建模,他们预测了细胞的轨迹。推导的算法足以处理细胞碰撞和脱离事件的物理特性。

变形性细胞术

通过观察单个细胞的变形,可以获得很多信息。这是因为定义细胞力学性能的某些细胞骨架特性会受到细胞状态(例如,健康还是病态)的强烈影响。^{2,3} 因此,正如 UCLA 教授 Di Carlo 和他的同事所论证的那样,变形性(在施加压力下形状变化的程度)可以用作确定细胞周期阶段、细胞分化程度、转移潜能和白细胞活化的有效生物标志物。^{3,4} 例如,癌细胞通常比良性细胞更具顺应性,这赋予了它们更容易通过新陈代谢在全身移动的能力。^{5,6}

在另一个例子中,测量变形性的能力可区分健康的血细胞和感染疟疾的血细胞,已知被感染的那些血细胞比未感染的血细

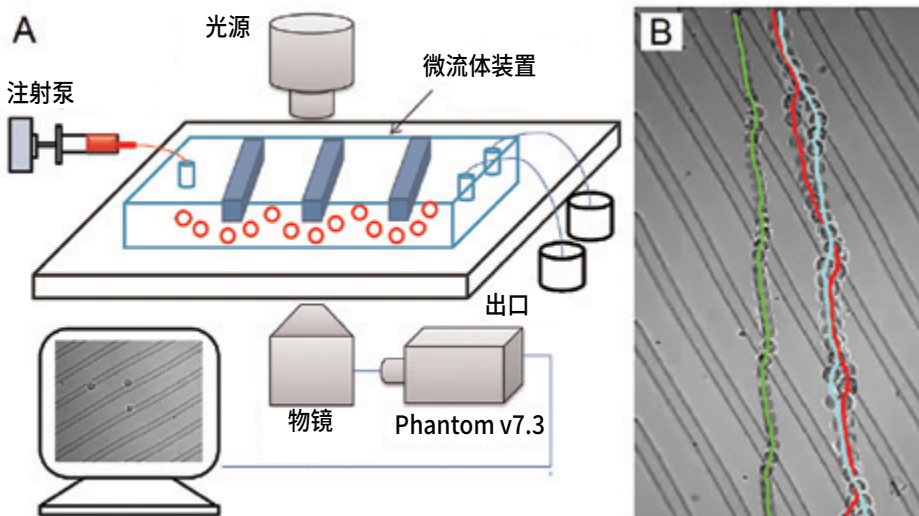


图3: (A) 实验装置的示意图。(B) 图像显示了一叠帧,其中包含三个单独细胞的轨迹。经参考文献 1 作者许可后而修改的图像。

胞要硬得多。^{6,7} 变形性与细胞状态之间的相关性让研究人员看到了开发廉价无标记诊断技术的希望。

为了说明这一概念,加利福尼亚大学的研究人员制造了一种微流体装置,该装置具有一个拉伸流动区域,可以有规律地使快速移动的 MCF7 细胞(乳腺癌细胞系)变形,有关微流体芯片的概念和图片,请参见图 4A 和 B。⁸ 在该系统中,高流速可以使细胞速度达到约 $6.5 \mu\text{m}\cdot\mu\text{s}^{-1}$ (根据图 4C 所示的数据,细胞在 14 μs 内移动了约 91 μm)。为了捕获这种快速移动的细胞,研究人员将尼康 Eclipse Ti (10 倍物镜)与 Phantom v7.3 摄像机相结合,并将摄像机设置到 142,857 fps 的帧速率、256×32 的分辨率、1 μs 的曝光时间。

从图 4C 中的一系列快照可以看出,一旦细胞到达拉伸流动区域(在 $t = 28 \mu\text{s}$ 时),细胞就会受到严重的拉伸。通过测量纵轴和横轴(如图 4D 所示)可以对此进行量化。通过仔细观察图像数据,作者注意到沿运动方向的图像有些模糊。细胞的模糊归因于 1 μs 的曝光时间,因为在每次曝光期间,细胞移动约 6.5 μm (对于 20 μm 的细胞,约有 33% 的模糊,请参见方程式 3)。尽管存在运动模糊,但他们测量了约 2000 个细胞·s⁻¹ 的变形性,并使用了计算机处理来确定细胞的初始直径和变

形性,请参见图 4E 中此类分析的典型图。从图 4C 中可以明显看出,除了图像模糊之外,当细胞处于给定低分辨率下的视场时,摄像机只能捕捉五个帧。这归因于约 $6.5 \mu\text{m}\cdot\mu\text{s}^{-1}$ 的高细胞速度,在 142,857 fps 的帧速率下,它可使细胞在帧之间移动大约 46 μm (方程式 1)。

使用微流体装置使单个细胞变形的方不止一种。除了之前讨论过的让细胞处于延伸流场之外,奥尔巴尼大学和伦斯勒理工学院的研究人员最近采取了另一种途径,他们开发了一种所谓的惯性微流体细胞拉伸器。⁹ 在 2017 年的这项研究中,单个 MDA-MB -231 乳腺癌细胞(在其他类型的细胞中)以 $450 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度流动,并以 $4 \mu\text{m}\cdot\mu\text{s}^{-1}$ 的速度与刚性壁碰撞。捕捉碰撞的视频使研究人员能够量化碰撞前后细胞的长宽比,从而确定变形的程度。

快速变形过程使用 Phantom v2512 和 Zeiss Axio Observer A1 倒置显微镜 (10×) 进行了捕获,摄像机被设置为以 100,000 fps 的帧速率和 1 μs 的曝光时间采集一个 3s 长的视频。这样,吞吐量可以达到约 450 个细胞·s⁻¹。利用收集到的数据,研究人员利用定制算法以全自动方式计算了初始细胞直径和变形性。通过访问参考文献 6 中列出的网站,可以在辅助资料中免费获得原始视频数据。

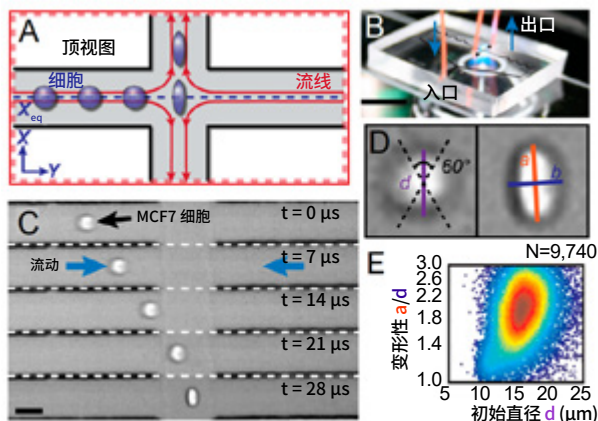


图4: (A) 延伸流动区示意图, (B) 微流体芯片的照片, (C) 进入延伸流动区然后发生变形的细胞快照, (D) 变形细胞的特写, (E) 密度散点图。注意: B 和 C 中的比例尺分别为 25 mm 和 40 μm。经参考文献 8 作者许可后而复制的图像。

分离循环肿瘤细胞

检测和监测某些癌症类型的一种非常有希望的方法是捕获血液中的循环肿瘤细胞 (CTC)。⁹ CTC 从肿瘤部位脱落进入血液, 然后在体内迁移, 具有核化新肿瘤的危险。¹⁰ 事实上, 在 2006 年的一篇综述论文中, 转移被认为是导致 90% 实体瘤患者死亡的原因。¹¹ 因此, 许多癌症研究人员仍对检测、移除和理解 CTC 非常感兴趣。不幸的是, 在 10^9 个血细胞中, 这些细胞通常只出现 1-100 个,¹² 因此很难被分离和检测。

麻省理工学院的研究人员与新加坡的学术和健康机构合作, 开发了一种具有螺旋形通道的微流体装置, 该装置能够利用离心力和侧向阻力分离细胞。^{12, 13} 此过程被称为: “Dean 流分离”, 用于在空间上隔离微通道横截面中不同大小的细胞, 有关一般概念, 请参见图 5A。^{12, 14, 15} 然后, 通过在适当的下游位置 (例如, 图 5A 中的横截面 A-A) 进行分叉, 可以将特定大小的细胞有效地引导至两种路径中的其中一种路径 (例如, 白细胞 (WBC) 与 (CTC)。在图 5 所示的示例中, 较小的细胞可以朝向外壁, 而较大的 CTC 可以集中在内壁。使用这项技术, 在所研究细胞系中, 他们可以分离出 80% 以上的癌细胞, 其中包括 MCF-7、T-24 和 MDA-MB-231 细胞。¹³ 通过将倒置相位对比 Olympus IX71 显微

镜与以 6400 fps 运行的 Phantom v9 相连接, 他们观察了分离过程。

在另一篇文章中, 通过串联两个级联螺旋, 可在一小时内处理 3 mL 的全血, CTC 的检出率为 100%。¹² 一项包括 20 名肺癌患者血液样本分析的临床试验也显示了成功检测出 5 至 88 个 $\text{CTC} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

封装和分选细胞

基因相同的细胞可能表现出完全不同的行为。^{16, 17} 基于这一事实, 正如 Chabert 和 Viovy 所说, 对大细胞群进行测量不能提供全面的信息。¹⁷ 为了更好地理解细胞间的变异性, 一些研究小组致力于开发通过封装过程分离单细胞的方法, 这可能会成为最终的单细胞研究方法。例如, 居里研究所的研究人员设计了一种微流体装置, 该装置能够将细胞封装在皮升大小的液滴中, 然后通流体动力效应对它们进行自动分选。¹⁷

研究人员通过将 Olympus direct BX41 显微镜 (40x) 与 Phantom 4.2 摄像机集成捕捉了动态事件。如图 6A 所示, 当细胞通

过通道时 (白色箭头所示), 它将导致射流颈破裂, 并形成一个充满细胞的液滴。同时, 还会形成许多较小的无细胞液滴。然而, 在两种不同类型的液滴离开通道之后, 它们将被引导至两种不同的路径, 参见图 6B。即使充满细胞的液滴倾向于沿着顶部路径行进 (而无细胞的液滴倾向于沿着底部路径行进), 但一些相对较小的充满细胞的液滴仍可以使它们沿着较低的路径行进, 如图 6B 中的白色箭头所示。

作者指出, 通过采集全血混合物然后封装和分选癌性 T 淋巴细胞, 有望在现实生活中应用该技术。作者还提到, 使用这种装置获得的富集不足以处理血液中的微转移, 但却足以处理感染了人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的基因型 T 细胞。¹⁷

结束语

从这些实例探究中可以看出, 从高通量生物医学微流体研究中收集高质量视频数据的必要条件包括每秒约数百至数十万帧的帧速率以及几微秒的曝光时间。尽管直觉上我们可能认为, 每秒仅 1 米的微对象应该很容易成像, 但从这些研究中我们可以发现事实并非如此。

本文没有详细讨论空间分辨率, 因为细胞的像素化显然不是一个局限性因素。通

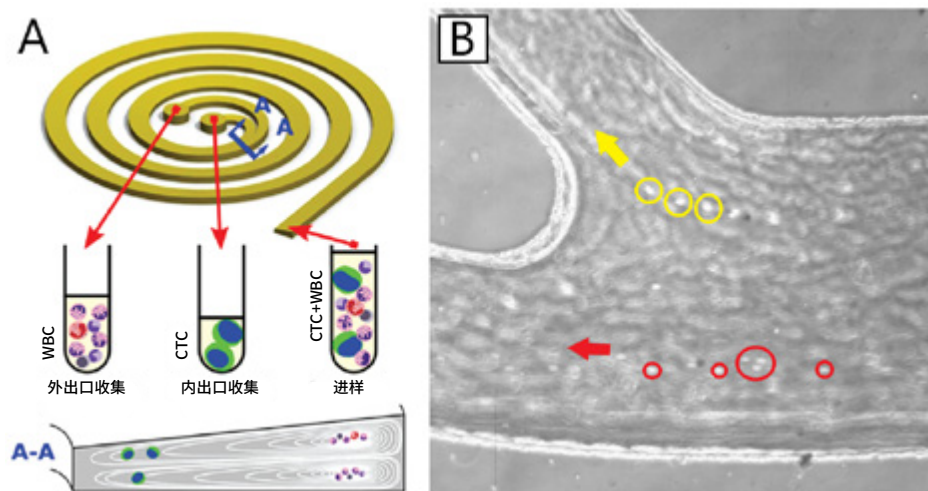


图5: (A) 概念示意图, (B) 微流体分叉的快照, 分别显示了在分叉的上通道和下通道区域中移动的 MDA-MB-231 细胞 (一些被黄色包围) 和白细胞 (一些被红色包围)。示意图和快照取自参考文献 13。经英国皇家化学学会许可复制。

生物医学微流体应用中的高速成像:原理与概述

常,常规显微镜研究中使用的摄像机的分辨率高达 2 千万像素,像素大小约为 1 微米。这些摄像机可为静态和慢速显微镜应用提供出色的空间分辨率。但是,对于超高速摄像机,传感器分辨率通常较低(例如 100 万像素),像素大小在 20 至 30 微米之间。这样可以显著提高帧速率,并提供捕获可靠图像数据所需的灵敏度和图像质量。为了提高某些高速生物医学微流控应用所需的帧速率(例如 > 100,000 fps),必须降低分辨率(例如:640 × 480 或 256 × 32)。因此,我们仍然需要同时具有高分辨率和超高帧速率的显微摄像机。

另外一个需要考虑的因素是,当用可见光拍摄亚微米大小的粒子时,其局限性取决于它的衍射极限。当对纳米尺寸的物体成像时,必须使用基于电子的成像。然而,常规电子显微镜可达到的帧速率仍然非常有限。例如,捕捉高分辨率像差校正的电子图像通常每帧要花费十秒钟的时间,用户还需要保持完全静止不动,同时保持外部实验室的振动在最小程度以避免噪声。随着技术的不断进步,出现了能够为涉及超小和超快物体的新兴尖端应用提

供时间和空间分辨率的仪器。

我希望本文能使初级和中级研究者了解该领域的最新研究,并为那些将来可能有兴趣研究高速微流体的人提供基本的指导。

注释

在讨论的每项研究中,录制的视频数据都可以以辅助材料的形式免费获取,这些视频可以通过点击相应参考文献中的链接进行访问。我们向所有出版商申请并获得了他们的版权许可。本文档随时可能更改,恕不另行通知。

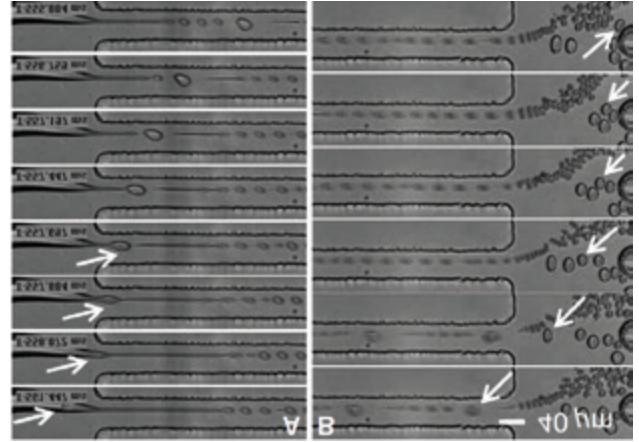


图6: 快照显示了(A)射流颈断裂和封装以及(B)分选过程。图像的转载已获参考文献 17 作者的许可。注意:白色箭头指向的是包含细胞的液滴。版权所有(2008)美国国家科学院

生物医学微流体应用中的高速成像:原理与概述

致谢

本文由 Toni Lucatorto, Gene Nepomuceno 和 Phil Taylor 审阅和编辑。

参考文献

1. J. Jeong, N. J. Froberg, E. Zhou 等。准确跟踪微流细胞分选设备中的单细胞运动轨迹,《公共科学图书馆期刊》(PLoS ONE) **2018**, 13, e0192463。
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192463>
2. O. Otto, P. Rosendahl, A. Mietke 等。实时变形性细胞术: 游动中细胞的力学表型分析, 自然方法 **2015**, 12, 199. doi:10.1038/nmeth.3281。
3. E. M. Darling, D. Di Carlo, 细胞力学性能的高通量评估, 生物医学工程年评 **2014**, 17, 1。
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040545>
4. D. Di Carlo, 医学中细胞状态的力学生物标记, 实验室自动化期刊 **2012**, 17, 32, DOI: 10.1177/2211068211431630。
5. S. Suresh, 癌细胞的生物力学和生物物理学, Acta Mater. **2007**, 55, 3989。
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040545>
6. Y. Deng, S. P. Davis, F. Yang 等。惯性微流控细胞拉伸器 (iMCS): 全自动、高通量和近实时的细胞力学分型, Small **2017**, 13, 1700705。
<https://doi.org/10.1002/sml.201700705>
7. H. A. Cranston, C. W. Boylan, G. L. Carroll 等。恶性疟原虫的成熟会破坏生理红细胞的变形性, Science **1984**, 223, 400, DOI: 10.1126/science.6362007。
<https://doi.org/10.1073/pnas.1200107109>
8. D. R. Gossett, H. T. K. Tse, S. A. Lee 等。用于大群体力学表型分析的单细胞的流体动力学拉伸, 美国国家科学院院刊 **2012**, 109, 7630。
<https://doi.org/10.1073/pnas.1012539107>
9. S. L. Stott, C.-H. Hsu, D. I. Tsukrov 等。使用产生微涡旋的人字形芯片分离循环肿瘤细胞, 美国国家科学院院刊 **2010**, 107, 18392。
<https://doi.org/10.1126/science.1203543>
10. C. L. Chaffer, R. A. Weinberg, 癌细胞转移的前景, 科学 **2011**, 331, 1559, DOI: 10.1126/science.1203543。
11. G. P. Gupta, J. Massagué, 癌症转移: 构建框架细胞, **2006**, 127, 679, DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.001。
12. H. W. Hou, M. E. Warkiani, B. L. Khoo 等。使用离心力分离和回收循环中的肿瘤细胞, 科技报告 **2013**, 3, 1259. doi:10.1038/srep01259。
13. M. E. Warkiani, G. Guan, K. B. Luan 等。用于超快速、无标签地分离循环肿瘤细胞的倾斜螺旋微流控技术。芯片实验室 **2014**, 14, 128, DOI: 10.1039/C3LC50617G。
14. S. S. Kuntaegowdanahalli, A. S. S. Bhagat, G. Kumar 等。用于在螺旋微通道中进行连续颗粒分离的惯性微流控技术。芯片实验室 **2009**, 9, 2973, DOI: 10.1039/B908271A。
15. A. Russom, A. K. Gupta, S. Nagrath 等弯曲的低纵横比微通道中粒子的差分惯性聚焦。新物理学杂志 **2009**, 11, 9. doi:10.1088/1367-2630/11/7/075025。
16. J. M. Raser E. K. O'Shea, 基因表达中的噪声: 起源、后果和控制。Science **2005**, 309, 2010, DOI: 10.1126/science.1105891。
17. M. Chabert, J.-L. Viovy, 单细胞微流控高通量封装和流体动力自分选, 美国国家科学院院刊 **2008**, 105, 3191。
<https://doi.org/10.1073/pnas.0708321105>

VISION
RESEARCH

AMETEK®
MATERIALS ANALYSIS DIVISION



关于VISION RESEARCH

Vision Research 设计并制造用于各种专业行业和应用数字高速摄像机。Vision Research 是 AMETEK 公司材料分析部的一个业务部门。

AMETEK Vision Research 的某些 Phantom 摄像机持有出口许可。欲了解更多信息, 请访问:



官方微信